บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำกากส่า

นำน้ำกากส่าสดที่ได้จากหอกลั่นจากโรงงานผลิตสุรา จังหวัดสุราษฎร์ธานี จากการเก็บตัวอย่าง 5 ครั้ง นำมาวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบต่างๆ ของน้ำกากส่าสด ได้ค่าเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ลักษณะของน้ำกากส่าสดจากโรงงานผลิตสุรา จังหวัดสุราษฎร์ธานี

Table 4. Composition of fresh slop waste from alcohol distillery plant at Surathanee Province.

Parameters	Average	
pH	4.52 ±0.01	
Temperature	94±1	^{0}C
COD	220,800±56.73	mg/ml
BOD	52,000±1000	mg/ml
Suspended solids	2,960±147.30	mg/ml
Total solids	148,572 ± 990.36	mg/ml
Settleable solids	40±1.42	mg/ml
Dissolved solid	145,612±103.88	mg/ml
Total-N	3,038±63.43	mg/ml
Reducing sugar	7,555±67.51	mg/ml

คุณสมบัติของน้ำกากส่าสด จากการวิเคราะห์พบว่า น้ำกากส่าสดจากโรงงานผลิตสุราจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีค่า pH 4.52, อุณหภูมิในขณะออกจากหอกลั่น 94 องศาเซลเซียส, COD 220,800 มิลลิกรัม/ลิตร, BOD 52,200 มิลลิกรัม/ลิตร, ของแข็งแขวนลอย 2,960 มิลลิกรัม/ลิตร,ของแข็งทั้งหมด 148,572 มิลลิกรัม/ลิตร, ของแข็งไม่ละลายน้ำ 40 มิลลิกรัม/ลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 7,555 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับโรงงานสุราอื่นๆ พบว่าให้ค่าไม่แตกต่างกัน คือ องค์ประกอบของน้ำกากส่าจากโรงงานไทยแอลกอฮอล์ และโรงงานแสงโสม ซึ่งตั้งอยู่ในจังหวัดนครปฐม พบว่า มีค่า pH 4.4-5.2, อุณหภูมิขณะออกจากหอกลั่น 82-85 องศาเซลเซียส และปริมาตรไนโตรเจนทั้งหมด 1,927-2,857 มิลลิกรัม/ลิตร แต่สำหรับค่า COD, BOD และของแข็งทั้งหมดมีค่าแตกต่างกันคือ 105,260-98, 192 มิลลิกรัม/ลิตร, 32,000-33,500 มิลลิกรัม/ลิตร และ 112,238-87,920 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ การที่โรงงานสุราจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีค่า COD, BOD และปริมาตรของแข็งทั้งหมดมากกว่าโรงงานแอลกอฮอล์ไทยและโรงงานแสงโสมทั้งนี้เนื่องจากระบบการกลั่นของแต่ละโรงงานที่แตกต่างกัน คือ การกลั่นของโรงงานสุราจังหวัดสุราษฎร์ธานีและโรงงานแสงโสมเป็นการแบบ Nondirect steam คือใช้ความร้อนจากไอน้ำ ไปกลั่นแอลกอฮอล์โดยไม่มีการสัมผัสกันระหว่างไอน้ำกับน้ำกากส่า ส่วนโรงงานแอลกอฮอล์ไทยเป็นระบบ direct steam คือใช้ความร้อนจากไอน้ำไปกลั่นแอลกอฮอล์ โดยไอน้ำกับกากส่าจะสัมผัสกันโดยตรง (สีวลี โปร่งทอง, 2541)

ตารางที่ 5 ปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในน้ำกากส่าสดจากโรงงานสุราจังหวัดสุราษฎร์ธานี

Table 5. Microbial counts of fresh slop waste from alcohol distillery plant at Surathanee Province.

Microorganisms	CFU/ml
Total bacteria	1.25×10^6-2.75×10^6
Total Lactic acid bacteria	1.75×10^5-1.80×10^6
Total *Bacillus* spp.	1.80×10^3-2.40×10^4
Total fungi	25-75
Total yeasts	2.50×10^3-3.75×10^4

จากตารางที่ 5 ในน้ำกากส่าสดจากโรงงานสุราจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, แบคทีเรียแลคติก, *Bacillus* spp., เชื้อรา และยีสต์ คือ 1.25×10^{6}-2.75×10^{6}, 1.75×10^{6}-1.80×10^{6}, 1.80×10^{3}-2.4×10^{4}, 25-75 และ2.50×10^{3}-3.75×10^{4} ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ กวิศิลป์ บูรณสมภพ (2546) พบว่าน้ำกากส่าสดที่เกิดจากกระบวนการกลั่นสุราที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบโดยใช้อุณหภูมิสูงเพื่อแยกน้ำสุราออกจากน้ำกากส่า ในน้ำกากส่าสดยังพบจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สามารถทนอุณหภูมิสูง ได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้, กลุ่ม *Bacillus* spp., กลุ่มแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์ และรา

2. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียและยีสต์จากน้ำกากส่า

นำน้ำกากส่าสดจากหอกลั่นโรงงานผลิตสุรา จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 13 วัน โดยวิธีการ pour plate ในอาหาร MRS agar, TSA และ YM agar ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ ในน้ำกากส่าหมักในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ ในน้ำกากส่าที่เก็บที่ 30^{0}C

Table 6. Change of lactic acid bacteria, *Bacillus* spp. and yeasts in slop waste during storage at 30^{0}C.

Fermentation time (day)	Lactic acic bacteria (CFU/ml)	*Bacillus* spp. (CFU/ml)	Yeasts (CFU/ml)
0	1.75×10^{5}	1.80×10^{3}	2.50×10^{3}
1	2.70×10^{5}	4.00×10^{3}	2.70×10^{4}
3	3.05×10^{5}	2.50×10^{3}	1.05×10^{5}
5	3.45×10^{5}	2.00×10^{3}	3.45×10^{6}
7	2.50×10^{6}	1.07×10^{3}	2.04×10^{6}
9	1.70×10^{6}	9.50×10^{2}	1.60×10^{7}
11	1.60×10^{6}	8.70×10^{2}	1.60×10^{7}
13	1.00×10^{5}	3.25×10^{2}	7.15×10^{6}

จากผลการทดลองตามตารางที่ 6 พบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลคติกและยีสต์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาในการหมักมากขึ้น โดยมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 7 และ 9 ของการหมักเท่ากับ 2.50×10^6 CFU/ml และ 1.60×10^7 CFU/ml และจะลดปริมาณลงเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ในขณะที่ *Bacillus* spp. จะมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 1 เท่ากับ 4.00×10^3 CFU/ml และปริมาณ *Bacillus* spp. ค่อยๆลดลงเมื่อเวลาที่ทำการหมักเพิ่มขึ้น จนกระทั่งในวันที่ 13 จะมีปริมาณ *Bacillus* spp. น้อยที่สุด

เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของน้ำกากส่าที่ผ่านการหมักข้างต้น โดยทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 5, 7, 11 และ 13 ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของน้ำกากส่าที่เก็บที่ 30^0C

Table 7. Change of chemical compositions of slop waste during storage at 30^0C.

Fermentation time (day)	COD (mg/l)	Total Nitrogen (mg/l)	Reducing Sugar (mg/l)	pH
0	220,800±56.73	3,038±63.43	7,555±67.51	4.52±0.01
3	206,080±45.23	3,010±57.40	8,100±77.45	4.48±0.01
5	191,360±41.63	3,150±68.32	7,373±62.42	4.41±0.01
7	117,760±41.56	3,122±67.30	7,173±54.35	4.40±0.01
11	100,995±52.47	3,066±45.21	6,845±63.15	4.68±0.02
13	98,850±54.95	3,030±45.43	5,480±46.85	4.50±0.01

จากผลการหมักน้ำกากส่า ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 13 วัน พบว่า ค่า COD และ reducing sugar มีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า total nitrogen และ pH มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์จากน้ำกากส่าที่ผ่านการหมัก ณ อุณหภูมิห้องในวันที่ให้ปริมาณจุลินทรีย์แต่ละชนิดสูงสุด คือ ในวันที่ 7, 1 และ 9 ตามลำดับ สุ่มเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน มาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบแกรมโดยหยด 3% KOH ย้อมแกรม เพื่อดูการติดสี รูปร่าง สปอร์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ ความสามารถในการสร้างเอนไซต์คะตะเลส สำหรับยีสต์ทำการตรวจสอบเบื้องต้นโดยการศึกษารูปร่างของเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8-10

ตารางที่ 8 การทดสอบแกรมและการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำกากส่าหมัก

Table 8. Gram stain and catalase activity of lactic acid bacteria from fermented slop waste.

Lactic Bacteria	Tests			
	3% H_2O_2	3% KOH	Gram staining	Shape
L_1- L_2	-	+	violet	long rod
L_3- L_8	-	+	violet	short rod
L_9- L_{10}	-	+	violet	long rod
L_{11}- L_{13}	-	+	violet	short rod
L_{14}	-	-	red	cocci
L_{15}- L_{24}	-	+	violet	short rod
L_{25}- L_{26}	-	+	violet	cocci
L_{27}- L_{28}	-	+	violet	short rod
L_{29}	-	-	red	short rod
L_{30}- L_{35}	-	+	violet	short rod
L_{36}	-	+	violet	long rod

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากน้ำกากส่าหมัก ณ อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 7 ของการหมัก พบว่า สามารถแยกได้ 36 ไอโซเลต เมื่อทดสอบแกรมโดยหยด 3% KOH และย้อมแกรม ให้ผลเป็นบวกและย้อมติดสีม่วง ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ให้เผลเป็นลบ ยกเว้นไอโซเลตที่ 14 และ 29 ให้ผลการทดสอบแกรมและย้อมแกรมเป็นลบ (ติดสีแดง) จึงสรุปได้ว่า การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจาก 36 ไอโซเลตที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแลคติกเพียง 34 ไอโซเลต

ตารางที่ 9 การทดสอบแกรมและการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากน้ำกากส่าหมัก

Table 9. Gram staining and catalase activity of *Bacillus* spp. from fermented slop waste**.**

Bacillus spp.	Characterization			
	3% H_2O_2	3% KOH	Gram staining	Shape
B_1-B_4	+	+	violet	ovule
B_5	+	-	red	rod
B_6	+	+	violet	rod, spore forming
B_7-B_{10}	+	+	violet	ovule
B_{11}-B_{15}	+	-	red	ovule
B_{16}	+	+	violet	rod, spore forming
B_{17}-B_{20}	+	+	violet	ovule
B_{21}-B_{23}	+	+	violet	short rod
B_{24}-B_{25}	-	-	red	short rod
B_{26}-B_{27}	+	+	violet	short rod
B_{28}	+	+	violet	ovule
B_{29}-B_{32}	+	-	red	cocci
B_{33}-B_{48}	+	+	violet	rod, spore forming

การคัดเลือก *Bacillus* spp. จากน้ำกากส่าหมัก ณ อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 1 ของการหมักเป็นวันที่ให้ปริมาณ *Bacillus* spp สูงสุด พบว่า สามารถแยกได้ 48 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบแกรมและย้อมแกรมให้ผลเป็นบวก และติดสีม่วง ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ผลเป็นบวก ยกเว้นไอโซเลตที่ 5, 11-15, 24, 25 และ 29-32 ให้ผลทดสอบแกรมและย้อมแกรมเป็นลบและติดสีแดง และเมื่อนำมาย้อมสปอร์พบว่า มีเฉพาะไอโซเลตที่ 6, 16 และ 33-48 เท่านั้นที่พบสปอร์ จึงสรุปได้ว่า การคัดเลือก *Bacillus* spp. จาก 48 ไอโซเลตที่ได้ เป็น *Bacillus* spp. เพียง 16 ไอโซเลตเท่านั้น

ตารางที่ 10 ลักษณะเบื้องต้นของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำกากส่าหมัก

Table 10. Preliminary characteristic of yeasts from fermented slop waste.

Yeasts	Preliminary characteristic	
	Cultural characteristics of yeast	Cells shape under microscopy
Y_1- Y_2	white colony, convex, circular and entire	short rod and no flagella
Y_3- Y_6	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod
Y_7- Y_8	white colony, convex, circular and entire	short rod and no flagella
Y_9- Y_{12}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{13}- Y_{14}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{15}- Y_{16}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{17}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{18}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{19}- Y_{20}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{21}- Y_{22}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{23}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{24}- Y_{25}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{26}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella
Y_{27}- Y_{30}	white colony, pulvinate, circular and lobate	short rod and no flagella

สำหรับการคัดแยกยีสต์จากน้ำกากส่าหมัก ณ อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 9 ของการหมักเป็นวันที่ให้ปริมาณยีสต์สูงสุดสามารถแยกได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต เมื่อทำการศึกษาลักษณะเบื้องต้นโดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าทั้ง 30 ไอโซเลตที่แยกได้เป็นยีสต์

3. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้จากน้ำกากส่า

จากการคัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์จากน้ำกากส่าหมัก พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ได้ 34, 16 และ 30 ไอโซเลต ตามลำดับ จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ มาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง, โปรตีน และไขมัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 โดยพบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่คัดเลือกได้ไม่สามารถย่อยแป้ง, ไขมัน และโปรตีนได้ *Bacillus* spp. ไอโซเลตที่ 33, 43 และ 44 สามารถย่อยแป้ง และไขมันได้ และมีเพียงยีสต์ไอโซเลตที่ 9, 10, 11, 12, 18, 19, 21, 22, 23 และ 24 เท่านั้นที่สามารถย่อยได้ทั้งแป้ง, ไขมัน และโปรตีน จากนั้นนำยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลตและ *Bacillus* spp. 9 ไอโซเลต ศึกษาการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 และความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3

ในการศึกษาความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่า ยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลต และ *Bacillus* spp. 9 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน จากนั้นนำยีสต์ และ *Bacillus* spp. ที่ผ่านการทดสอบข้างต้นมาทำการทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรด พบว่า ทั้งหมดมีความสามารถในการเจริญได้ในช่วง pH 1-5 และเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 4 จากนั้นนำยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลตและ *Bacillus* spp. 9 ไอโซเลต ที่ผ่านการทดสอบข้างต้นมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง (*Vibio haveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus*) พบว่ามีเพียง *Bacillus* sp. 1 ไอโซเลต คือ B43 ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 11 การย่อยแป้ง, ไขมัน และโปรตีน โดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำกากส่า

Table 11. Hydrolysis of starch, fat and protein by isolated microorganism from slop waste.

Microorganisms	Tests		
	Starch	Fat	Protein
Lactic acid bacteria			
L_1- L_{36}	-	-	-
Bacillus spp.			
B_6- B_{16}	-	-	-
B_{33}	+	+	-
B_{34}	-	-	-
B_{35}- B_{39}	-	+	-
B_{40}- B_{42}	-	-	-
B_{43}- B_{44}	+	+	-
B_{45}	-	+	-
B_{45}- B_{48}	-	-	-
Yeasts			
Y_1- Y_3	-	-	-
Y_4	-	+	-
Y_5- Y_8	-	-	-
Y_9- Y_{12}	+	+	+
Y_{13}- Y_{16}	-	+	-
Y_{18}- Y_{19}	+	+	+
Y_{20}	+	-	-
Y_{21}- Y_{24}	+	+	+
Y_{25}- Y_{30}	-	-	-

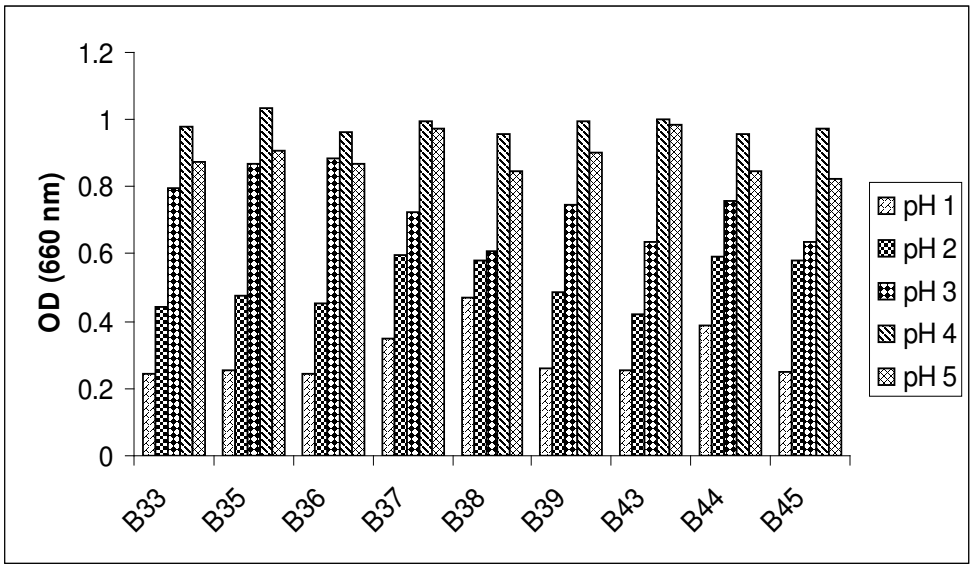
\+ No utilize

\- Utilize

ตารางที่ 12 การเจริญภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนที่ 35^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของ *Bacillus* spp. และยีสต์ที่แยกได้จากน้ำกากส่า

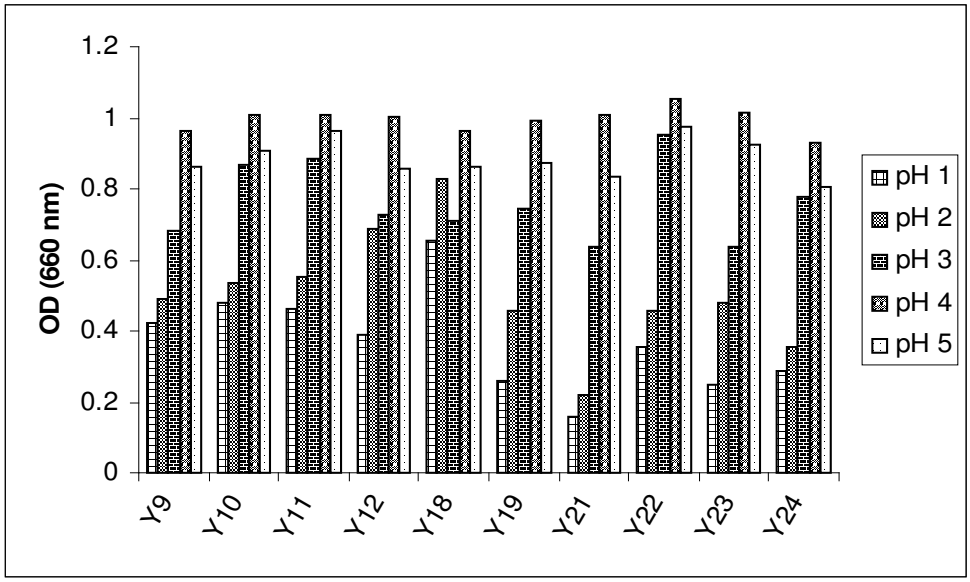
Table 12. Growth under both aerobic and anaerobic conditions at 35^{0}C for 24 hours of *Bacillus* spp. and yeasts from slop waste.

Microorganisms	Growth condition (OD 660 nm)	
	aerobic	anaerobic
Bacillus spp.		
B33	0.52	0.55
B35	0.65	0.61
B36	0.44	0.38
B37	0.78	0.65
B38	0.66	0.47
B39	0.56	0.65
B43	0.55	0.49
B44	0.63	0.65
B45	0.66	0.63
Yeasts		
Y9	0.42	0.52
Y10	0.65	0.67
Y11	0.54	0.43
Y12	0.75	0.78
Y18	0.61	0.55
Y19	0.63	0.58
Y21	0.54	0.57
Y22	0.44	0.44
Y23	0.59	0.65
Y24	0.63	0.56



ภาพที่ 2 ผลของพีเอชต่อการเจริญของ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิ 37^0C 24 ชั่วโมง

Figure 2. Effect of pH on growth of isolated *Bacillus* spp. from slop waste at 37^0C, 24 h.



ภาพที่ 3 ผลของพีเอชต่อการเจริญของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิ 37^0C 24 ชั่วโมง

Figure 3. Effect of pH on growth of isolated yeasts from slop waste at 37^0C, 24 h.

ตารางที่ 13 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง (*Vibrio harveyi* และ*Vibrio parahaemolyticus*) ของ *Bacillus* spp. และยีสต์ที่แยกได้จากน้ำกากส่า

Table 13. Inhibition of pathogenic bacteria of shrimp (*Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus)* by *Bacillus* spp. and yeasts from slop waste.

Microorganisms	Inhibition	
	Vibio haveyi	*Vibrio parahaemolyticus*
Bacillus spp.		
B33	-	-
B35- B39	-	-
B43	+	-
B44	-	-
B45	-	-
Yeasts		
Y9- Y12	-	-
Y18	-	-
Y19	-	-
Y21- Y24	-	

\+ Inhibition

\- No Inhibition

การนำคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกมาใช้ในสัตว์น้ำนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ซึ่งการทดสอบคุณสมบัติส่วนใหญ่จะศึกษา ความสามารถในการย่อยสารอาหารต่างๆ การเจริญเติบโตที่ pH ต่ำ และการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อให้เกิดความสมดุลของระบบทางเดินอาหาร และการส่งเสริมการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำด้วย (Gullian *et al*., 2004) สำหรับการศึกษาการเจริญที่ระดับ pH 1-5 พบว่า *Bacillus* spp. 9 ไอโซเลต และยีสต์ 10 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 4 ซึ่งในระบบทางเดินอาหารของกุ้งมี pH 4.5-6.0 (มนตรี พิมพ์ใจ และเกศินี บรรจง, 2546) ซึ่งค่า pH นี้จะทำให้เอนไซม์น้ำย่อยรวมถึงจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่างๆ ภายในลำไส้ทำงานได้อย่างดี การย่อยและการดูดซึมอาหารเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อก่อโรคต่างๆ ซึ่งไม่ใช่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ เพราะไม่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดในลำไส้ได้ ซึ่งสภาวะความเป็นกรดในลำไส้นั้นค่อนข้างคงที่ แต่จะลดความเป็นกรดภาย

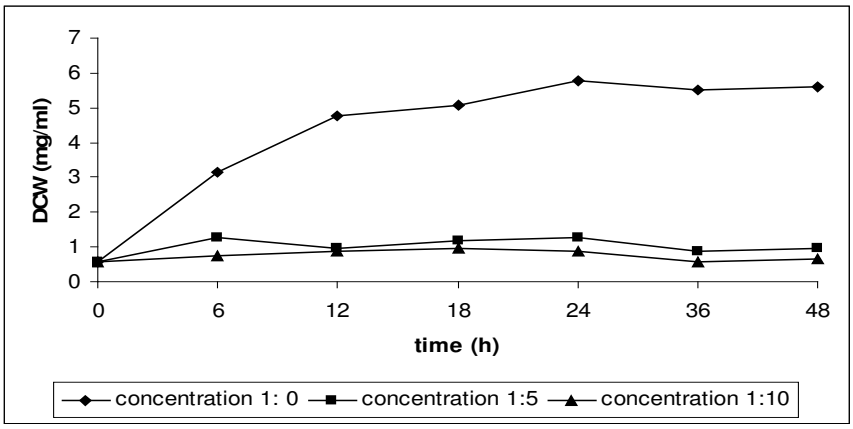
ในลำไส้ก็ต่อเมื่อกุ้งกินอาหารเข้าไป ซึ่งเป็นระดับความเป็นกรดภายในบริเวณลำไส้ของกุ้ง พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และคณะ (2541) ได้ทำการศึกษา การเพิ่มค่า pH ของน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งจาก 7.1-10.0 จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียลดลง ดังนั้น *Bacillus* spp. และยีสต์ ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จึงสามารถเจริญเติบโตใน pH ที่ระดับต่างๆได้ โดยสามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะสิ่งแวดล้อมภายนอกและภายในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง

ในปัจจุบันวิธีการเพาะเลี้ยงกุ้งสมัยใหม่ เป็นระบบพัฒนาแบบหนาแน่น จึงต้องใช้อาหารในปริมาณมาก เพื่อให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูง จากสาเหตุดังกล่าวทำให้เกิดผลเสียเนื่องจากคุณภาพของน้ำเสื่อมจากการสลายสารอาหารของกุ้ง นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณออกซิเจนลดต่ำลงเนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ ซึ่งส่งผลเสียต่อการเจริญของกุ้งอีกด้วย ดังนั้น *Bacillus* spp. และยีสต์ที่คัดเลือกมาได้สามารถหลั่งเอ็นไซม์ออกมาจากเซลล์ เช่น โปรติเอส, ไลเปส และอะไมเลส ซึ่งสามารถย่อยสารอาหารประเภทโปรตีน, ไขมัน และแป้งได้ จึงเป็นการช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ (Chin and Chen, 1987) และจากการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง พบว่ามีเพียง *Bacillus* sp. 1 ไอโซเลต คือ B43 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sugita และคณะ (1996) ได้ตรวจพบว่าในทางเดินอาหารของปลามี *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นและพบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้ทั้งหมด 65 สายพันธุ์มีเพียง 1 สายพันธุ์คือ *Bacillus* NM 14 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา คือ *Vibrio vulnificus* และ *Pasteurella piscicida* จากสมบัตินี้จึงมีการนำ *Bacillus* NM 14 ไปใช้เป็นโปรไบโอติกเสริมในปลาเพื่อลดการเกิดโรคติดเชื้อในปลา นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยของ วิจิตรา ลีละศภกุล และคณะ (2541) พบว่า *B. subtilis* บางสายพันธุ์มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง คือ *V. harveyi* ได้ โดยเป้าหมายที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* เช่น สารปฏิชีวนะที่ *B. subtilis* ผลิตออกมา กลไกการยับยั้งของ *B. subtilis* ที่มีต่อ *V. harveyi* เอนไซม์ที่ *B. subtilis* ปล่อยออกมา และการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัย และจากการศึกษาข้างต้นพบว่า ยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งจากรายงานของ Bevanand Makower, 1963 (อ้างโดย Cain, 2001) พบว่า ยีสต์ได้สร้างสารพิษที่เรียกว่า yeast killer toxin ซึ่งเป็นสารพวกโปรตีน ซึ่งมีการหลั่งออกมาจากเซลล์ยีสต์ โดยพิษที่สร้างขึ้นนี้จะไม่มีอันตรายต่อตัวเซลล์ของยีสต์ที่สร้างเอง แต่จะมีพิษต่อยีสต์ชนิดอื่นๆ โดยจะไม่มีผลกับจุลินทรีย์ประเภทอื่นๆ

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียและยีสต์ในน้ำกากส่า

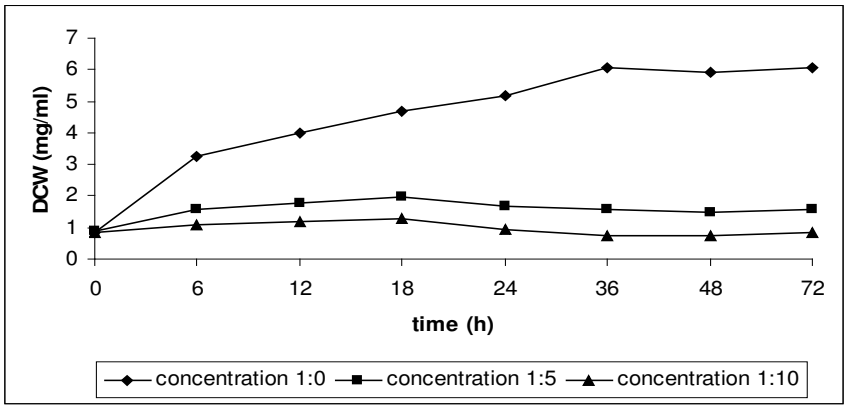
จากการทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติก พบว่า มีเพียง *Bacillus* sp. 1ไอโซเลต คือ B43 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวได้ แต่จากการศึกษาข้างต้นพบว่า ยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลต ถึงแม้ว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แต่ก็มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก คือสามารถย่อยโปรตีน, ไขมัน, แป้ง, ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และความสามารถในการเจริญได้ดีที่ pH 3-5 จึงทำการคัดเลือกยีสต์ 1 ไอโซเลต นั่นคือ Y22 นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตต่อไป โดยทำการศึกษาเกี่ยวกับ ระดับความเข้มข้นของน้ำกากส่าที่มีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. (B43) และยีสต์ (Y22) ให้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5 พบว่า ทั้ง B43 และ Y22 เจริญได้ดีที่สุดในน้ำกากส่าที่ระดับความเข้มข้น 1:0 โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลาในการเลี้ยง 24 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 5.77 และ 6.07 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งในการนำน้ำกากส่ามาเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นเป็นผลเนื่องจากในน้ำกากส่ามีน้ำตาลเหลืออยู่ ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ดี ฉะนั้นในการนำน้ำกากส่ามาเลี้ยงจุลินทรีย์จึงเพียงแต่เติมแหล่งไนโตรเจนเพียงเล็กน้อย เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำกากส่าดังกล่าวมีค่าบีโอดี และซีโอดีลดลง จึงถือได้ว่าเป็นการช่วยลดมลภาวะในน้ำกากส่าได้อีกทางหนึ่งด้วย (Kujala *et. al*., 1976)

หลังจากศึกษาการเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. (B43) และยีสต์ (Y22) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของน้ำกากส่าแล้ว จึงนำ B43 และ Y22 มาทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส และ pH 4.5, 6.0 และ 7.5 ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7 พบว่าทั้ง B43 และ Y22 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 7.5 โดยให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดที่เวลาในการเลี้ยง 18 และ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 18.07 และ 14.34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการนำน้ำกากส่าใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นได้มีการศึกษา โดยทำการทดลองเลี้ยง *Spirulina platensis* ด้วยน้ำกากส่า ที่เตรียมขึ้นด้วยความเข้มข้น 0-10% เป็นเวลา 16 วัน พบว่าทุกความเข้มข้นเหมาะสมต่อการเลี้ยง *S. platensis* และยังให้ผลพลอยได้ในการฟอกสีของน้ำกากส่าโดยลดความเข้มสี (จรูญ ลีไตรรงค์, 2531) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shojaosadati และคณะ (1999) ทดลองเลี้ยงยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ *Candida rugosa* ในน้ำกากส่าสดพบว่าได้ผลในการลดซีโอดี เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4 การเจริญของ *Bacillus* sp. (B43) ในน้ำกากส่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

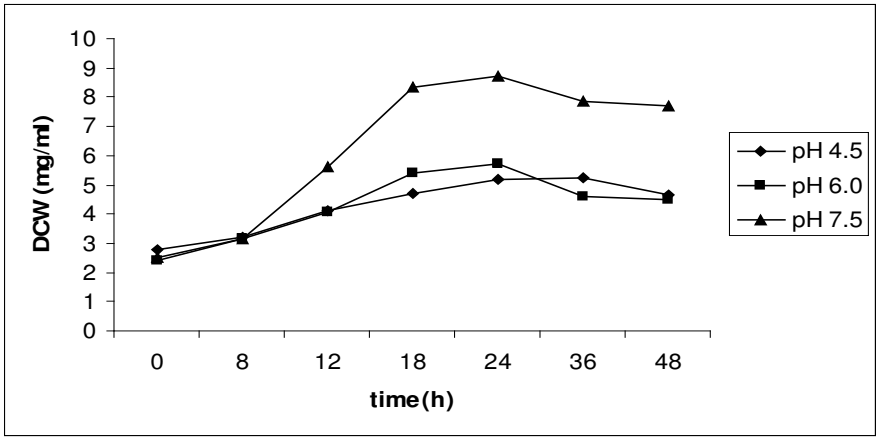
Figure 4. Growth of *Bacillus* sp. (B43) in various concentrations of the slop waste.



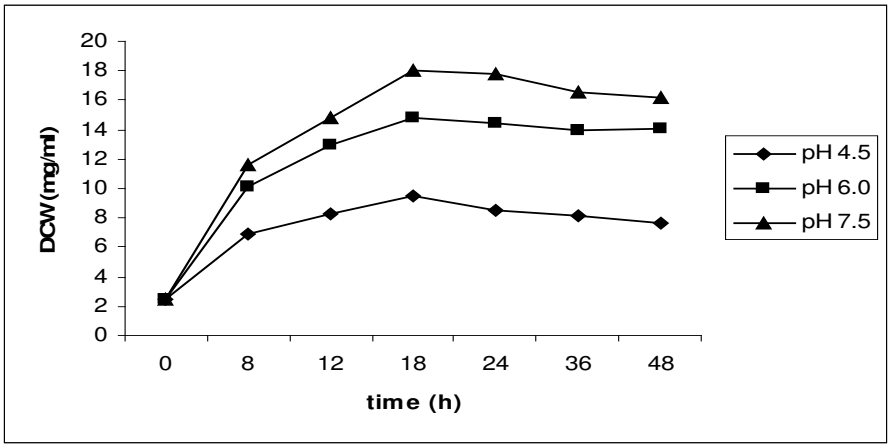
ภาพที่ 5 การเจริญของยีสต์ (Y22) ในน้ำกากส่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Figure 5. Growth of yeast (Y22) in various concentrations of the slop waste.

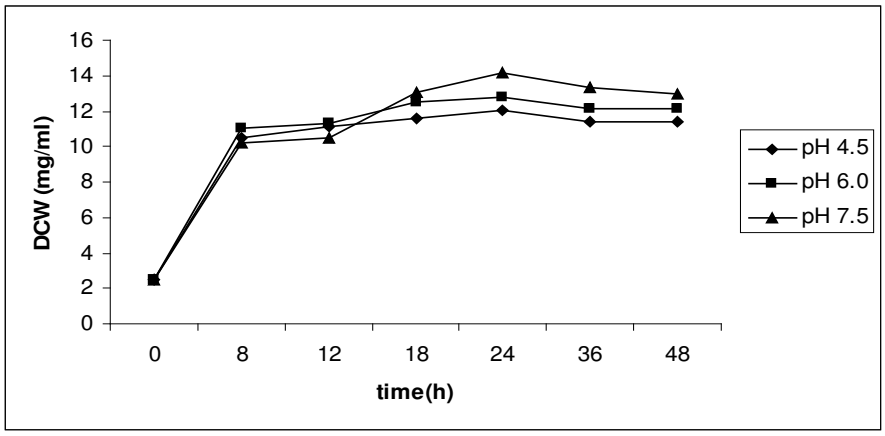
Gonzalez (1980) ที่ได้ทดลองนำยีสต์มาเลี้ยงในน้ำกากส่าในระดับการเจือจางที่ 1:1 หลังจากเลี้ยง 24 ชั่วโมงสามารถลดบีโอดีได้ 60 เปอร์เซ็นต์และได้ยีสต์เป็นผลผลิต 10 กรัม/ลิตร นอกจากนี้Gonzalez (1979) ยังได้ทำการทดลองนำเชื้อราหลายสายพันธุ์มาเลี้ยงในน้ำกากส่าพบว่า เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus phoenicis* H-13 ให้ผลผลิต 17 กรัม/ลิตร เทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (potato dextrose broth) ซึ่งให้ผลผลิตเพียง 3.5 กรัม/ลิตร



(ก)



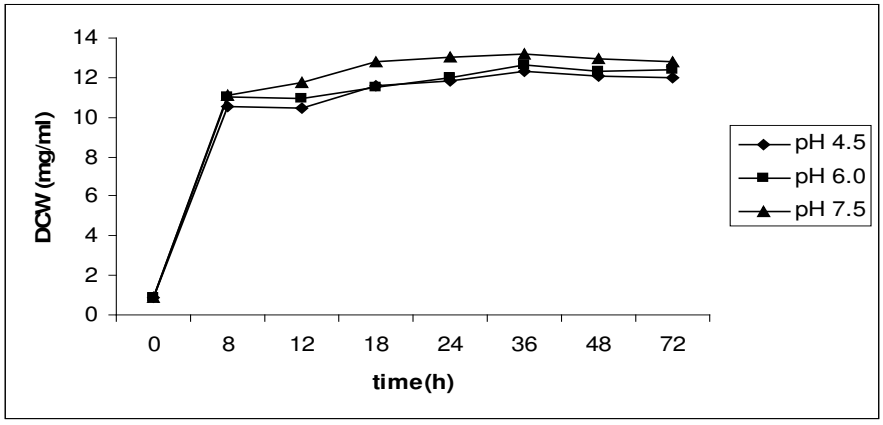
(ข)



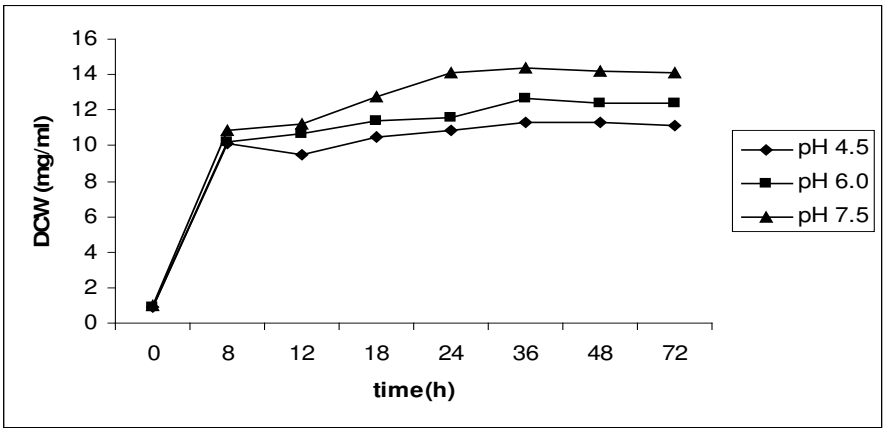
(ค)

ภาพที่ 6 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. (B43) ในน้ำกากส่าที่ความเข้มข้น 1:0 **ก** . 30^0C **ข** . 37^0C **ค** . 45^0C

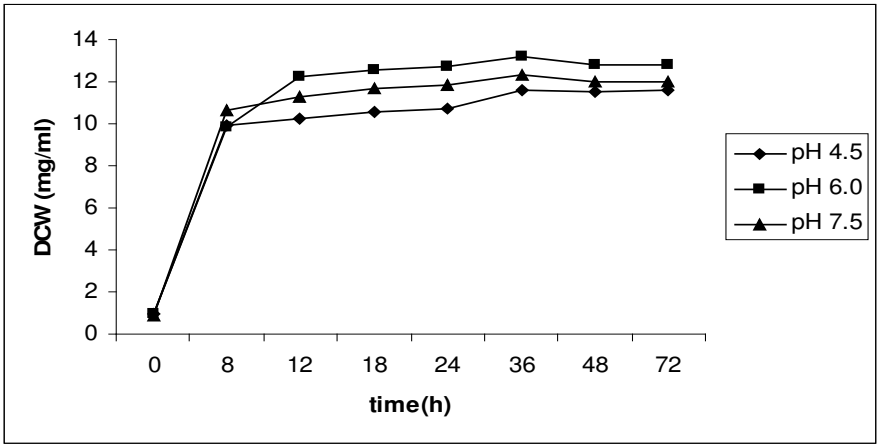
Figure 6. Effect of pH and temperature on the growth of *Bacillus* sp. (B43) in slop waste (concentration 1:0). (a) 30^0C (b) 37^0C (c) 45^0C



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 7 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของยีสต์ (Y22) ในน้ำกากส่าที่ความเข้มข้น 1:0 **ก** . 30^0C **ข** . 37^0C **ค** . 45^0C

Figure 7. Effect of pH and temperature on the growth of yeast (Y22) in slop waste (concentration 1:0). (a) 30^0C (b) 37^0C (c) 45^0C

5. การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียและยีสต์ในกุ้งขาว

จากการคัดเลือกและการทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียและยีสต์จากน้ำกากส่าหมัก สามารถคัดเลือก *Bacillus* sp. และยีสต์อย่างละ 1 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตที่ได้มาผสมในอาหารเม็ด (เอราวัณ 1003 พี บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน)) เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว โดยทำการเลี้ยงกุ้งขาวที่มีอายุ 1 เดือน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดควบคุม ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดธรรมดาที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ในระหว่างการเลี้ยงได้ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำในตู้เลี้ยงกุ้งขาว ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่า อุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 26-27 องศาเซลเซียส, pH อยู่ระหว่าง 7.4-7.6, ความเค็ม 15 ppt, แอมโมเนีย (NH_3) อยู่ระหว่าง 0-0.01 มิลลิกรัม/ลิตร, ค่าไนไตรท์ (NO_2) อยู่ระหว่าง 0.3-0.4 มิลลิกรัม/ลิตร และค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) อยู่ระหว่าง 51-68 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะต่อการเจริญของกุ้งขาว โดยกุ้งต้องการอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็นจึงไม่สามารถรักษาอุณหภูมิให้คงที่ได้เหมือนสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตามธรรมชาติจะไม่มีผลต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดมากเกินไปจะทำให้การกินอาหารและเจริญเติบโตของกุ้งลดลง ค่า pH โดยทั่วไปน้ำในบ่อกุ้งมีค่า pH อยู่ในช่วง 7.5-8.0 ส่วน pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้งคือ 6.0-9.0 และถ้า pH ของน้ำอยู่ในช่วง 4.0-6.0 หรือ 9.0-11.0 จะมีผลให้กุ้งโตช้า pH ที่ต่ำกว่า 4.0 หรือสูงกว่า 11.0 จะมีผลให้อัตราการตายของกุ้งมากขึ้น (Boyd, 1989)) ความเค็ม ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้ง น้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่มีความเค็มอยู่ในช่วง 5-38 ppt กุ้งจะโตช้าเมื่อน้ำมีความเค็มสูงกว่า 25 ppt กุ้งขาวจะโตได้ดีเมื่อมีความเค็มอยู่ในช่วง 10-20 ppt (Boyd, 1989) และถ้าความเค็มเปลี่ยนแปลงอย่างเร็วรวดจะทำให้กุ้งตายได้สำหรับกุ้งน้ำจืด ถ้าแอมโมเนียในน้ำมีความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้อัตราการเจริญลดลง (Wickins, 1976 อ้างโดยบรรจง เทียนส่งรัศมี, 2530) และถ้ามีแอมโมเนียอยู่ในช่วง 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สัตว์น้ำจะตายภายใน 24-72 ชั่วโมง (Boyd, 1989) และถึงแม้ว่าค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งยังไม่

สามารถระบุได้ชัดเจน อย่างไรก็ตามค่าที่ให้ผลการเลี้ยงที่ดี จะอยู่ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร Boyd และ Daniels (1993) รายงานว่าในการเลี้ยงกุ้งค่าความเป็นด่างต้องไม่ต่ำกว่า 50 มก./ลิตร

เมื่อครบกำหนดในการเลี้ยงกุ้งขาว เป็นเวลา 6 สัปดาห์ นำกุ้งขาวมาทำการศึกษาการเจริญเติบโตต่อวัน (G) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่า ในทุกชุดการทดลอง อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (G) อยู่ในช่วง 2.03-4.44 โดยพบว่า ชุดการทดลองที่ 4 คือ ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ (Y22) ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลามีอัตราการเจริญต่อวันสูงสุด คือ 4.44 และชุดควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันต่ำสุด คือ 2.03 การที่ชุดการทดลองที่มีการผสมเซลล์ยีสต์สด (Y22) กับอาหารเม็ด มีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันดีที่สุด เนื่องจากโปรไบโอติกยีสต์สามารถไปปรับปรุงการดูดซึมอาหาร และการย่อยสลายโปรตีน ทำให้ง่ายต่อการดูดซึมและนำไปใช้ในกุ้ง (Noh *et al*., 1994) เมื่อนำกุ้งขาวที่เลี้ยงจนครบ 6 สัปดาห์ มาทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตาย, ปริมาณเม็ดเลือด และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ผลดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 14 คุณภาพน้ำในตู้เลี้ยงกุ้งขาวหลังจากได้รับ *Bacillus* sp. (B43) และยีสต์ (Y22) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

Table 14. Quality of water during cultivating of white shrimp feeding with *Bacillus* sp. (B43) and yeast (Y22) during 6 weeks.

Treatment*	Week	Temperature (^{0}C)	pH	Salinity (ppt)	NH_3 (mg/l)	NO_2 (mg/l)	Alkaline (mg/l)
1	0	26	7.5	15	0.01	0.3	51
	2	26	7.5	15	0.01	0.4	51
	4	26	7.6	15	0.00	0.4	68
	6	26	7.5	15	0.01	0.3	51
2	0	26	7.5	15	0.01	0.4	68
	2	26	7.5	15	0.01	0.4	68
	4	26	7.6	15	0.01	0.4	51
	6	26	7.6	15	0.01	0.4	68
3	0	26	7.5	15	0.00	0.3	68
	2	26	7.6	15	0.01	0.3	68
	4	26	7.6	15	0.00	0.4	68
	6	26	7.5	15	0.01	0.3	68
4	0	26	7.4	15	0.00	0.3	51
	2	26	7.6	15	0.00	0.3	68
	4	26	7.5	15	0.00	0.3	68
	6	26	7.4	15	0.01	0.4	68
Control	0	26	7.5	15	0.01	0.3	68
	2	26	7.5	15	0.01	0.4	68
	4	26	7.4	15	0.01	0.4	68
	6	26	7.6	15	0.01	0.4	51

* ดูรายละเอียดในตารางที่ 16

ตารางที่ 15 การเจริญเติบโตของกุ้งขาวหลังจากได้รับ *Bacillus* sp. (B43) และยีสต์ (Y22) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

Table 15. The growth of white shrimp after feeding with *Bacillus* sp. (B43) and yeast (Y22) for 6 weeks.

Treatment*	Week	Weight (g)	Growth (G)
1	0	3.51	
	2	5.00	
	4	9.30	
	6	12.00	3.80
2	0	3.46	
	2	5.00	
	4	10.00	
	6	12.83	4.12
3	0	3.48	
	2	5.33	
	4	9.33	
	6	12.50	3.99
4	0	3.58	
	2	6.33	
	4	11.17	
	6	14.33	4.44
Control	0	3.55	
	2	4.00	
	4	5.33	
	6	6.50	2.03

* ดูรายละเอียดในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่ได้รับ *Bacillus* sp. (B43) และยีสต์ (Y22) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

Table 16. Immunity of white shrimp after feeding with *Bacillus* sp. (B43) and yeast (Y22) for 6 weeks.

Treatment*	% Survival	Total haemocytes ($\times 10^7$ cell/ml)	PO activity (unit/min/mg protein)
1	70 ± 0.00	1.31 ± 0.59^{a}	27.99 ± 12.36^{a}
2	75 ± 0.71	1.31 ± 0.31^{a}	54.59 ± 19.35^{a}
3	80 ± 0.00	2.36 ± 0.88^{bc}	130.60 ± 46.83^{b}
4	80 ± 0.00	2.50 ± 0.61^{c}	232.67 ± 63.24^{c}
Control	80 ± 0.00	1.39 ± 0.31^{a}	27.14 ± 6.45^{a}

*Treatment 1 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Treatment 2 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Treatment 3 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Treatment 4 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Control ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดธรรมดาที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

หลังจากการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า กุ้งมีอัตราการรอดตาย 80% ได้แก่ กุ้งในชุดการทดลองที่ 3, 4 และชุดควบคุม สำหรับกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. (B43) ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 และ 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา มีอัตราการรอดตาย 70% และ 75% ตามลำดับ การวิเคราะห์เม็ดเลือดรวมในกุ้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่ 4 ให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.50×10^7 cell/ml และในชุดการทดลองที่ 1, 2 และชุดควบคุม ให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย 1.31×10^7 , 1.31×10^7 และ 1.39×10^7 cell/ml ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติที่ค่า

ความเชื่อมั่น 95% พบว่า ทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณเม็ดเลือดรวมที่มาก แสดงให้เห็นว่า กุ้งมีภูมิคุ้มกันที่สูง การที่กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดที่สูงจะส่งผลให้กุ้งสามารถกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งได้อย่างเพียงพอ และมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งจะทำหน้าที่กำจัดเซลล์สิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายกุ้ง (Smite and Ratcliffe, 1980) Ruangsri *et al*. (2004) พบว่า กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะมีปริมาณเม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนต่ำกว่ากุ้งปกติมากเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเป็นสิ่งแปลกปลอม เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้งเม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับเพื่อกำจัดออกนอกตัว จึงทำให้เม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนลดลง และสอดคล้องกับรายงานของ Martin *et al*. (1993) โดยพบว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง *Sicyonia ingentis* ลดลง 20% หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียไป 24 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งใช้เซลล์สดของยีสต์ที่ระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหารผสมในอาหารมีปริมาณสูงสุดนั้นแสดงว่า ยีสต์ที่ผสมในอาหารสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวได้ สำหรับการวิเคราะห์ PO activity พบว่า ในชุดการทดลองที่ 4 ให้ค่ามากที่สุด คือ 232.67 unit/min/mg protein และชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และชุดควบคุม มีค่า 27.99, 54.59, 130.60 และ 27.14 unit/min/mg protein ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% พบว่าชุดการทดลองที่ 4 ให้ค่า PO activity ที่สูงที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะกุ้งได้รับเชื้อยีสต์ โดยที่ผนังเซลล์ที่มีส่วนประกอบของโพลีแซคคาไรด์และเปปติโดไกลแคน ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ จึงทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดความว่องไวของฟีนอลออกซิเดสและระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ในร่างกายได้ ซึ่งสอดคล้องกับนักวิทยาศาสตร์หลายคนที่มีการนำยีสต์มาใช้ในสัตว์น้ำ โดย Nakano *et al*. (1999) ได้ทำการศึกษาโดยการผสมยีสต์ในอาหาร 10.87% เปรียบเทียบกับไม่ได้ผสมยีสต์ในอาหารพบว่ามีปริมาณน้ำหนักเพิ่มขึ้น 138.7% และ125.8% ตามลำดับ และอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งต่อวัน มีค่าเท่ากับ 1.56% สำหรับไม่ผสมยีสต์มี 1.35% นอกจากกุ้งแล้ว ยังมีการใช้ยีสต์ในสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น Lara-flores (2003) ได้ศึกษาผลของยีสต์ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของปลาหมอเทศ โดยใช้ยีสต์ 0.1% เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมยีสต์ โดยให้อาหารเป็นเวลา 9 สัปดาห์ ปรากฏว่าอาหารที่ผสมโปรไบโอติกจะให้การเจริญเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม และเพิ่มประสิทธิภาพการกินอาหาร แสดงว่ายีสต์เป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตของการเลี้ยงปลาหมดเทศได้ดี และยังมีการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ โดยทำการคัดเลือกยีสต์ *Rhodotorula rubra, R. glutinis* และ *Candida zeylanoides* จากลำไส้ของปลา มาเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยีสต์ (Vazqvez-Juarez *et al*., 1993) ซึ่งนอกจากนำยีสต์ไปใช้ในลักษณะเป็นเซลล์แล้ว ยังมีการสกัดสาร astaxanthin จากยีสต์สีแดง โดย Storebakken *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษา astaxanthin จากยีสต์สีแดง โดยศึกษา 3 ระดับ คือ 45% 70% และ 97% เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้ผสมด้วยยีสต์ นำไปเลี้ยงปลาเทราท์ เป็นเวลา 92 วัน ทำให้สามารถ

เพิ่มน้ำหนักของกล้ามเนื้อ จาก 3.7% เป็น 17.4% นอกจากนี้ Chien *et al.* (2003) ยังพบว่า astaxanthin มีประโยชน์โดยสามารถต้านทานต่อความเค็มที่ระดับความเข้มข้นสูงได้อีกด้วย

นำกุ้งขาวที่เหลือในแต่ละชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 14-16 ตัว) ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ หลังจากได้ผ่านการให้อาหารที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. (B43) และยีสต์ (Y22) มาทำการทดสอบการทนต่อการเกิดโรคเรืองแสง (*V. harveyi*) ติดตามอัตราการรอดตายหลังจากฉีดเชื้อก่อโรค เป็นเวลา 10 วัน ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวหลังจากฉีด *V. harveyi* (10^7 CFU/ml)

Table 17. Survival rate of white shrimp after injection with *V. harveyi* (10^7 CFU/ml).

Treatment*	% Survival
1	42.86 ± 0.00^{a}
2	62.50 ± 1.41^{ab}
3	81.25 ± 0.71^{b}
4	93.75 ± 0.71^{b}
Control	50.00 ± 1.41^{a}

*Treatment 1 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Treatment 2 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Treatment 3 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Treatment 4 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

Control ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดธรรมดาที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

จากการศึกษาอัตราการรอดตายของกุ้งขาวหลังจากฉีด *V. harveyi* ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml เป็นเวลา 10 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งเป็นชุดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ที่ระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร ให้ % การรอดตายสูงสุด คือ 93.75 และในชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และชุดควบคุม ให้% การรอดตาย คือ 42.86, 62.50, 81.25 และ 50 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่กุ้งที่ได้รับเซลล์สดของยีสต์มีระบบภูมิคุ้มกันโรคเพิ่มมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากปริมาณเม็ดเลือด และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในชุดการทดลองที่ 4 มีค่ามากที่สุด ทำให้กุ้งสามารถทน

ต่อเชื้อโรคได้นาน เมื่อฉีดเชื้อก่อโรคเข้าไปในกุ้ง จึงทำให้มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด เนื่องจากกลุ่มของเม็ดเลือดจะมีระบบกำจัดเชื้อได้ทันที และมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Scholz *et al*. (1999) พบว่าความสามารถของกุ้งในการกำจัด *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ BPO5 ออกจากเลือดของกุ้ง โดยให้กินอาหารที่ผสมยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma* HPPR1 และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยีสต์ ผลปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นชุดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. (B43) ที่ระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร ให้อัตราการรอดตายต่ำสุดและต่ำกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้เพราะในชุดการทดลองนี้ให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสต่ำสุด คือ 1.31± 0.59 cell/ml และ 27.99±12.36 unit/min/mg protein ทำให้กุ้งขาวในชุดการทดลองนี้มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำเมื่อได้รับเชื้อก่อโรคเข้าไป จึงทำให้ทนต่อเชื้อได้น้อย นอกจากนี้ในระหว่างการเลี้ยงขณะที่กุ้งมีการลอกคราบซึ่งเป็นช่วงเวลาที่กุ้งจะอ่อนแอที่สุดกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 จะมีการกินกันเองด้วย